



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Fotoisomerización de interruptores moleculares basados en el cromóforo de la proteína verde fluorescente

Autor/es

MARTA DEL POZO SANTOLAYA

Director/es

MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ BARRANCO y DIEGO SAMPEDRO RUIZ ,

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

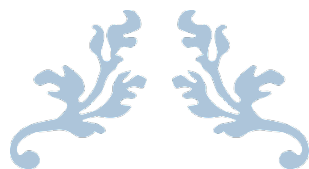
QUÍMICA

Curso académico

2018-19



***Fotoisomerización de interruptores moleculares basados en el cromóforo de la proteína verde fluorescente***, de MARTA DEL POZO SANTOLAYA  
(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.  
Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



---

# FOTOISOMERIZACIÓN DE INTERRUPTORES MOLECULARES BASADOS EN EL CROMÓFORO DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE

---



Trabajo de Fin de grado

Grado en Química

Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad de la Rioja.

Marta del Pozo Santolaya

Tutores: Miguel Ángel Rodríguez Barranco y Diego Sampedro Ruiz

Curso 2018-2019. Convocatoria de septiembre 2019



Me gustaría agradecer a todo el grupo de fotoquímica de la Universidad de La Rioja por haberme acogido y ayudando durante todo mi trabajo de fin de grado. En especial a mis tutores Miguel Ángel Rodríguez y Diego Sampedro que en todo momento han estado ahí para cualquier duda o problema que me surgiera.

También dar las gracias a mis amigos y compañeros de clase por el apoyo recibido a lo largo de toda la carrera y por los buenos momentos que hemos pasado juntos.

Por último, a mis padres, mi hermana y toda mi familia por su apoyo durante toda esta etapa ya que sin ellos no hubiese sido posible.



---

# Índice

---

Abreviaciones.....	3
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Introducción.....	11
Antecedentes.....	15
1. Interruptores moleculares.....	15
1.1. Tipos de interruptores moleculares.....	15
2. Luz visible como fuente de energía.....	19
3. Fotocatalizadores.....	21
Objetivos.....	25
Desarrollo de resultados y discusión.....	29
Conclusiones.....	39
Procedimiento experimental.....	43
1. Consideraciones generales.....	43
2. Síntesis de interruptores moleculares basados en el cromóforo de la GFP.....	44
3. Síntesis del compuesto 6.....	45
3.1. Caracterización del compuesto 6.....	45
4. Estudio fotoquímico.....	46
5. Separación cromatográfica de isómeros.....	46
Anexo.....	49





---

## Abreviaciones

---



CCF: Cromatografía de capa fina  
D: doblete (en RMN)  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DMSO-d<sub>6</sub>: dimetilsulfóxido deuterado  
ESI (+): electrospray con detección de ion positivo  
EY: eosina Y  
GFP: proteína verde fluorescente  
hν: luz, fotones, irradiación  
*J*: constante de acoplamiento  
LED: light emitting diode  
PBS: base de Schiff protonada  
RMN <sup>13</sup>C: resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C  
RMN <sup>1</sup>H: resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H  
s: singlete (en RMN)  
S<sub>0</sub>: estado fundamental  
S<sub>1</sub>: primer estado excitado singlete  
S', S'': estímulo externo  
T<sub>1</sub>: estado triplete  
t: triplete (en RMN)  
UV: ultravioleta  
UV-Vis: ultravioleta-visible  
δ: Desplazamiento químico  
λ: Longitud de onda



---

## RESUMEN

---



## RESUMEN

Este trabajo de fin de grado se centra en el estudio fotoquímico de una serie de interruptores moleculares análogos del cromóforo de la proteína verde fluorescente que como respuesta a un estímulo lumínico producen una fotoisomerización de forma indirecta.

Se trata de reacciones de fotocatalisis con luz visible que tienen lugar gracias a la utilización de fotocatalizadores que absorben esta radiación. También se comparará el efecto de dos de estos fotocatalizadores en la isomerización de análogos del cromóforo de la GFP, tanto su eficacia como sus ventajas y desventajas respecto a la toxicidad, precio y sostenibilidad.

## ABSTRACT

This final project focuses on the photochemical study of a series of molecular switches which are analogues of the green fluorescent protein chromophore that, in response to a light stimulus, they indirectly produce photoisomerization.

It is about photocatalysis reactions with visible light which take place thanks to the use of photocatalysts that absorb this type of radiation. It will also be compared the effect of two of these photocatalysts on the isomerization of analogues of GFP chromophore, its efficiency as well as its advantages and disadvantages regard to toxicity, price and sustainability.



---

# INTRODUCCIÓN

---



## INTRODUCCIÓN

La fotoquímica es la rama de la química que hace referencia a las reacciones químicas promovidas por la absorción de luz visible, radiación ultravioleta o infrarroja. Numerosas especies son capaces de captar fotones y acceder a un estado excitado que luego producirá un proceso químico. La excitación puede producirse directamente sobre el sustrato o por la capacidad de algunos catalizadores de absorber luz y después activar los sustratos que en esas condiciones no absorben, este último caso es del que trata este trabajo. Las especies fotoexcitadas interactúan con otros componentes de la reacción utilizando diferentes mecanismos como transferencia de energía, transferencia de electrones o transferencia de átomos.

La primera reacción fotoquímica descrita fue por Trommsdorff en 1834, cuando describió cómo los cristales de  $\alpha$ -santonina se volvían amarillos y “estallaban” cuando se exponían a la luz solar<sup>1</sup>.

Inicialmente apareció como área de aplicaciones limitadas, pero, ya en 1912<sup>2</sup>, Ciamician reconoció que la luz tenía el potencial de servir como un reactivo barato, abundante, renovable y no contaminante para la síntesis química. A pesar del interés de la comunidad química cada vez más consciente del medio ambiente, las síntesis fotoquímicas han tenido una aplicación limitada. Un obstáculo fundamental es la incapacidad de las moléculas orgánicas más comunes para absorber las longitudes de onda de la luz visible. Sin embargo, en cuestión de 10 años atrás, cuando los trabajos de MacMillan, que realizó una alquilación intramolecular enantioselectiva de aldehídos<sup>3</sup>, o de Yoon que llevó a cabo una cicloadición [2+2]<sup>4</sup>, ambas mediante fotocatálisis con luz visible, conceptualizaron el campo de la fotocatálisis redox. Este enfoque explotaba la capacidad de un catalizador orgánico o de un complejo metálico de absorber la luz con el fin de acelerar los procesos químicos. Además, generalmente requieren luces de baja energía, temperatura ambiente y reactivos estables que hacen que se generen pequeñas cantidades de radicales en condiciones muy suaves. Esto contrasta con las estrategias clásicas donde se usaba radiación UV mucho más energética, que daba

---

<sup>1</sup> Natarajan, A., Tsai, C., Khan, S., McCarren, P., Houk, K. and Garcia-Garibay, M. (2007). The Photoarrangement of  $\alpha$ -Santonin is a Single-Crystal-to-Single-Crystal Reaction: A Long Kept Secret in Solid-State Organic Chemistry Revealed. *Journal of the American Chemical Society*, 129(32), pp.9846-9847.

<sup>2</sup> Ciamician, G. (1912). THE PHOTOCHEMISTRY OF THE FUTURE. *Science*, 36(926), pp.385-394.

<sup>3</sup> Nicewicz, D. and MacMillan, D. (2008). Merging Photoredox Catalysis with Organocatalysis: The Direct Asymmetric Alkylation of Aldehydes. *Science*, 322(5898), pp.77-80.

<sup>4</sup> Ischay, M., Anzovino, M., Du, J. and Yoon, T. (2008). Efficient Visible Light Photocatalysis of [2+2] Enone Cycloadditions. *Journal of the American Chemical Society*, 130(39), pp.12886-12887.

lugar a altas cantidades de radicales, o era necesario usar altas temperaturas de reacción.

Todas estas ventajas fueron reconocidas rápidamente por la comunidad sintética y hoy en día en la industria se están llevando a cabo numerosas investigaciones en procesos de fotocatalisis y se ha convertido en una herramienta ampliamente utilizada en química moderna. El uso de luz solar para impulsar procesos fotoquímicos es una posibilidad ya presente, el problema viene debido a la poca reproducibilidad del proceso debido al clima y la irradiación no uniforme. Como alternativa a esto surgen los LED de alta potencia<sup>5</sup> muy utilizados en fotoquímica y que se usarán en este trabajo.

Estos procesos también son llevados a cabo por algunos organismos vivos, que son capaces de absorber luz desencadenando una respuesta, como consecuencia de la presencia de proteínas que experimentan cambios en su conformación por un estímulo lumínico. Una de las más importantes es la proteína verde fluorescente (GFP) que se obtuvo de la medusa *Aequorea victoria* en 1962<sup>6</sup>. Desde que la GFP se descubrió ha sido objeto de considerables estudios y utilizados como herramientas esenciales en biología molecular, biofísica y bioquímica. Esta proteína consta de un cromóforo el cual es el causante de este comportamiento ya que experimenta procesos de fluorescencia y otros procesos no radiativos como la fotoisomerización *Z/E*<sup>7</sup>. Variaciones en la estructura de este cromóforo permiten obtener modificaciones de las propiedades fotoquímicas y fotofísicas que permitirán su aplicación en numerosos ámbitos como, por ejemplo, en sensibilizadores en células solares, en dispositivos nanobiofotónicos o en el almacenamiento de datos ópticos<sup>6</sup>.

---

<sup>5</sup> Buzzetti, L., Crisenza, G. and Melchiorre, P. (2019). Mechanistic Studies in Photocatalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(12), pp.3730-3747.

<sup>6</sup> Acharya, A., Bogdanov, A., Grigorenko, B., Bravaya, K., Nemukhin, A., Lukyanov, K. and Krylov, A. (2016). Photoinduced Chemistry in Fluorescent Proteins: Curse or Blessing. *Chemical Reviews*, 117(2), pp.758-795.

<sup>7</sup> Blanco-Lomas, M., Funes-Ardoiz, I., Campos, P. and Sampedro, D. (2013). Oxazolone-Based Photoswitches: Synthesis and Properties. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(29), pp.6611-6618.

---

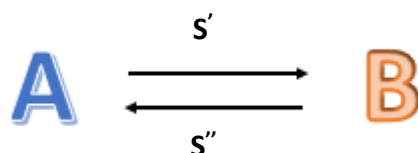
## ANTECEDENTES

---



## 1. Interruptores moleculares

Se denominan de esta manera a moléculas con capacidad de disponerse de dos formas o configuraciones distintas dependiendo de factores externos.



La capacidad de este tipo de sistemas los hace muy útiles en numerosas aplicaciones, como para activar y desactivar un compuesto biológico, o incluso pueden ser válidos como instrumento de diagnóstico para estudiar sistemas vivos complejos usando la luz.

Se pueden utilizar diferentes estímulos para generar estos cambios, como, por ejemplo, estímulos químicos, electroquímicos o térmicos. Sin embargo, el que mayores ventajas presenta es el estímulo lumínico debido a que no genera residuos, permite una selección de la longitud de onda a un precio bajo gracias a los dispositivos ópticos actuales y además se puede controlar fácilmente.

### 1.1. Tipos de interruptores moleculares.

En general se pueden clasificar en dos grandes grupos según el efecto que tenga el estímulo en la molécula, de ciclación o de isomerización.

En este trabajo vamos a centrarnos en los basados en una isomerización fotoquímica Z/E. Algunos ejemplos de este tipo de procesos son los azobencenos, alquenos impedidos, cromóforo de la rodopsina o cromóforo de la proteína verde fluorescente.

#### - Azobencenos

Se trata de un diazeno en el que dos hidrógenos han sido sustituidos por dos grupos fenilo. Este tipo de compuestos han sido de los más utilizados como interruptores moleculares debido a su eficiente absorción de luz, su eficiente fotoisomerización Z/E pero sobretodo su facilidad de síntesis y funcionalización<sup>8</sup>.

---

<sup>8</sup> García-Iriepa, C., Marazzi, M., Frutos, L. and Sampedro, D. (2013). E/Z Photochemical switches: syntheses, properties and applications. *RSC Advances*, 3(18), p.6241.

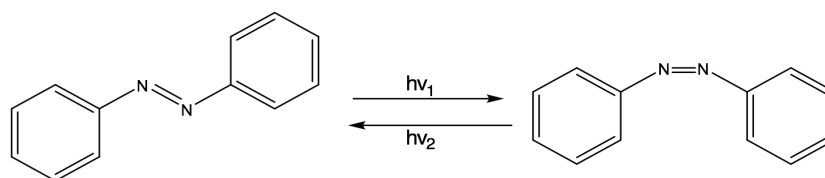


Figura 1. Isomerización Z/E de azobenceno.

La síntesis de este tipo de compuestos se puede llevar a cabo por distintos mecanismos como acoplamiento oxidativo de aminas aromáticas, reducción de compuestos aromáticos con grupo nitro, acoplamiento de aminas con compuestos con grupo nitroso o acoplamiento azo.

#### - Alquenos impedidos

Su estructura se basa en una parte superior (rotor) y una parte inferior estática, ambas unidas por un doble enlace que es el eje de rotación. Cuando surgieron se trataba de unos interruptores moleculares prometedores debido a su capacidad de someterse a un movimiento rotatorio repetitivo unidireccional impulsado por la luz<sup>9</sup>.

Estos interruptores se someten a fotoisomerización Z/E causando una interconversión reversible entre dos formas helicoidales. El primer interruptor molecular de este tipo data de 1992<sup>9</sup>. La estructura básica de este tipo de moléculas se muestra en la siguiente figura.

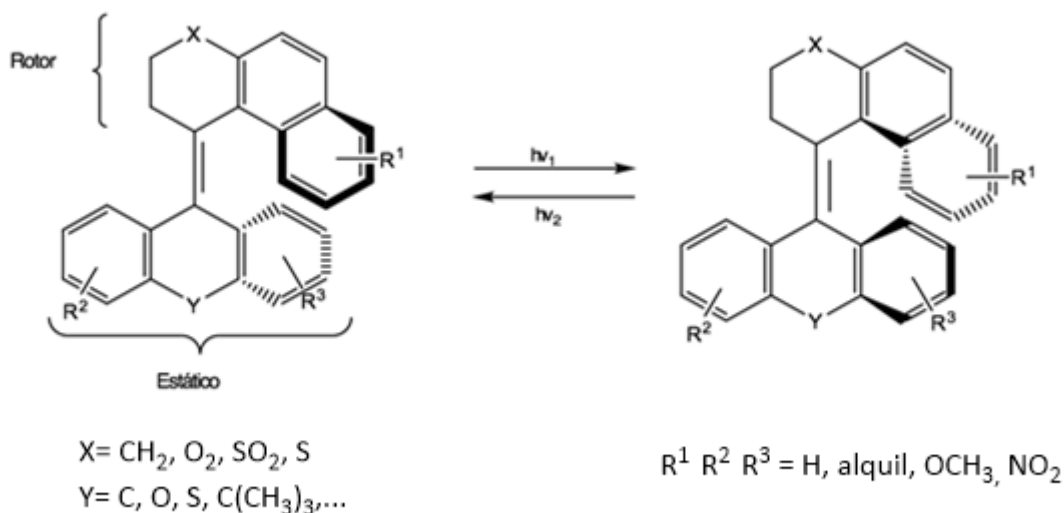


Figura 2. Proceso de isomerización de alquenos impedidos<sup>8</sup>.

<sup>9</sup> Bauer, J., Hou, L., Kistemaker, J. and Feringa, B. (2014). Tuning the Rotation Rate of Light-Driven Molecular Motors. *The Journal of Organic Chemistry*, 79(10), pp.4446-4455.



## - Basados en cromóforos de proteínas

En los últimos años han surgido un nuevo tipo de interruptores moleculares basados en cromóforos de proteínas. Una de ellas es la rodopsina, su fotoexcitación produce la isomerización con alta eficacia de su cromóforo, que presenta la estructura de la base de Schiff protonada del retinal (PSB)<sup>10</sup>. Tiene un rendimiento cuántico de isomerización *in vivo* de 0.67<sup>10</sup>, por ello ha sido ampliamente estudiado y utilizado como un patrón para nuevos interruptores moleculares activados por la luz.

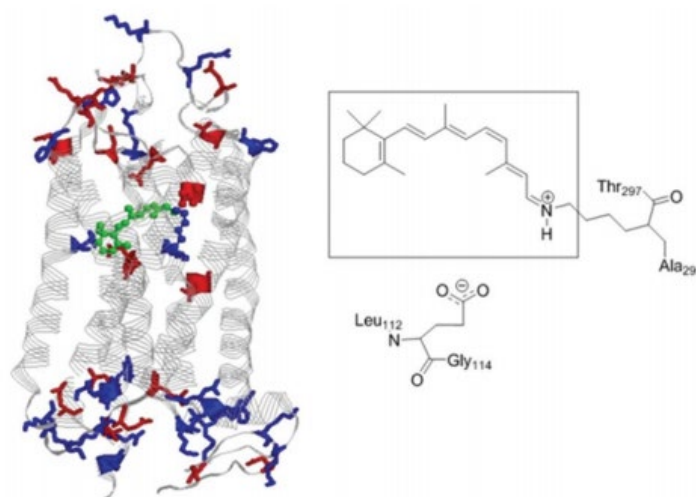


Figura 3. Estructura de la rodopsina y su cromóforo<sup>8</sup>.

Otro ejemplo de biomoléculas que se comportan de esta manera frente a estímulos lumínicos es la proteína verde fluorescente (GFP), que se descubrió en el pacífico en medusas *Aequorea victoria* en 1962 y fue inicialmente muy usada como marcador biológico. Su estructura se caracteriza por una estructura terciaria conocida como barril beta que encierra una hélice que contiene el cromóforo<sup>8</sup>.

Estas GFP son moléculas fluorescentes cuyas propiedades ópticas se deben a su cromóforo fotoexcitable emisor de luz verde (508 nm)<sup>11</sup>. Además de estos procesos radiativos también se ha demostrado que produce isomerizaciones *Z/E*.

<sup>10</sup> Blanco-Lomas, M., Campos, P. and Sampedro, D. (2012). Synthesis and Photoisomerization of Rhodopsin-Based Molecular Switches. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012(32), pp.6328-6334.

<sup>11</sup> Yang, J., Huang, G., Liu, Y. and Peng, S. (2008). Photoisomerization of the green fluorescence protein chromophore and the Meta- and para-amino analogues. *Chemical Communications*, (11), p.1344.

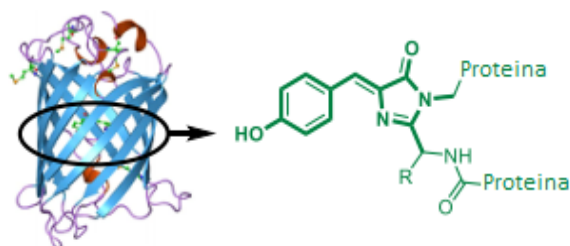


Figura 4. Estructura de la proteína verde fluorescente y su cromóforo *p*-hidroxibenciliden imidazolinona<sup>12</sup>.

Por ello, en los últimos años se han realizado numerosas investigaciones para el estudio de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de análogos de este cromóforo, demostrando su amplia diversidad espectral<sup>13</sup>. En concreto en este trabajo se van a utilizar 5-arilidenhidantoinas, donde la unidad de imidazolina se reemplaza por una de imidazolinona.

Estos análogos han demostrado tener buenas propiedades de absorción ultravioleta, lo cual los hace muy útiles en la industria cosmética, además de una alta estabilidad térmica y fotoquímica<sup>14</sup>. Debido a que no absorben en el visible, en este trabajo se irradiarán en presencia de fotocatalizadores que sí son capaces de hacerlo.

<sup>12</sup> Jancsó, A., Kovács, E., Cseri, L., Rózsa, B., Galbács, G., Csizmadia, I. and Mucsi, Z. (2019). Synthesis and spectroscopic characterization of novel GFP chromophore analogues based on aminoimidazolinone derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 218, pp.161-170.

<sup>13</sup> Ivashkin, P., Yampolsky, I. and Lukyanov, K. (2009). Synthesis and properties of chromophores of fluorescent proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(6), pp.652-669.

<sup>14</sup> Martínez-López, D., Yu, M., García-Iriepa, C., Campos, P., Frutos, L., Golen, J., Rasapalli, S. and Sampedro, D. (2015). Hydantoin-Based Molecular Photoswitches. *The Journal of Organic Chemistry*, 80(8), pp.3929-3939.

## 2. Luz visible como fuente de energía

La actual demanda en el uso de fuentes de energía más sostenibles han propiciado el creciente desarrollo de rutas más económicas y ecológicas para la síntesis química. En este contexto surge la utilización de la luz visible en fotocatalisis como un reactivo con todas las características necesarias para desarrollar química sostenible.

La mayoría de estas reacciones se llevan a cabo por un mecanismo de transferencia de un electrón del fotocatalizador excitado por luz visible al sustrato orgánico. A continuación, se muestra un esquema del mecanismo.

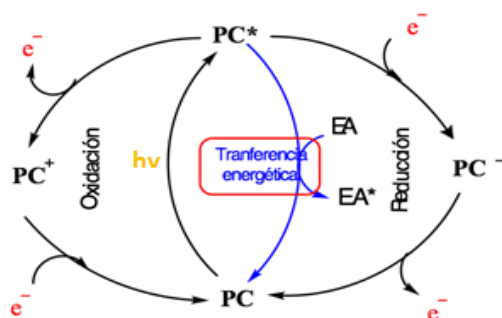


Figura 5. Mecanismo de transferencia de electrón por irradiación con luz visible<sup>15</sup>.

Se pueden dar dos ciclos, oxidativo o reductivo. El catalizador (PC) se excita por la irradiación luz visible y posteriormente sufre una oxidación o reducción con el sustrato para generar un anión o catión radical. Como los potenciales de oxidación/reducción de los sustratos orgánicos y los fotocatalizadores a veces no son compatibles, el fotocatalizador puede actuar como un dador de energía activando a un aceptor de energía (EA).

Por otro lado, hay otro tipo de procesos en el que ocurre una transferencia de energía y no estarán condicionados por los potenciales redox. Serán procesos de transferencia de energía que se dan desde el estado excitado triplete del fotocatalizador a un estado fundamental más bajo en energía de la molécula aceptora.

Este tipo de procesos dependerán de la energía del estado excitado triplete del fotocatalizador y del sustrato. El esquema del proceso se describe en la Figura 6.

<sup>15</sup> Zhou, Q., Zou, Y., Lu, L. and Xiao, W. (2018). Visible-Light-Induced Organic Photochemical Reactions through Energy-Transfer Pathways. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(6), pp.1586-1604.

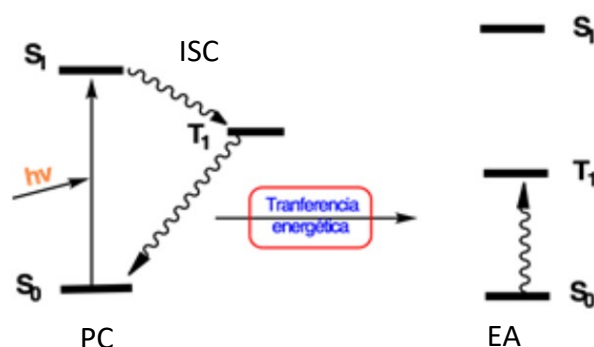


Figura 6. Mecanismo de transferencia de energía por irradiación con luz visible<sup>15</sup>.

El fotocatalizador absorbe luz visible y se excita del estado singlete  $S_0$  al  $S_1$  para posteriormente dar un cruce intersistemas (ISC) y pasar del  $S_1$  al estado triplete  $T_1$ .

Una vez en el estado triplete, se produce la transferencia de energía al sustrato y éste se excitará desde el estado singlete  $S_0$  al triplete.

Para que se produzca este proceso la energía del estado triplete del fotocatalizador debe ser mayor que la del sustrato. El fotocatalizador debe tener una alta tasa de cruce intersistemas ya que eso aumentará el rendimiento cuántico.

Los catalizadores de rutenio o iridio, como  $\text{Ir(ppy)}_3$  o  $\text{Ru(bpy)}_3^{2+}$ , así como catalizadores orgánicos, como Eosina Y, son muy efectivos en estos procesos debido a su alta energía del estado triplete. A continuación, se muestran las estructuras de estos fotocatalizadores así como sus potenciales de oxidación/reducción y longitud de onda de máxima absorción.

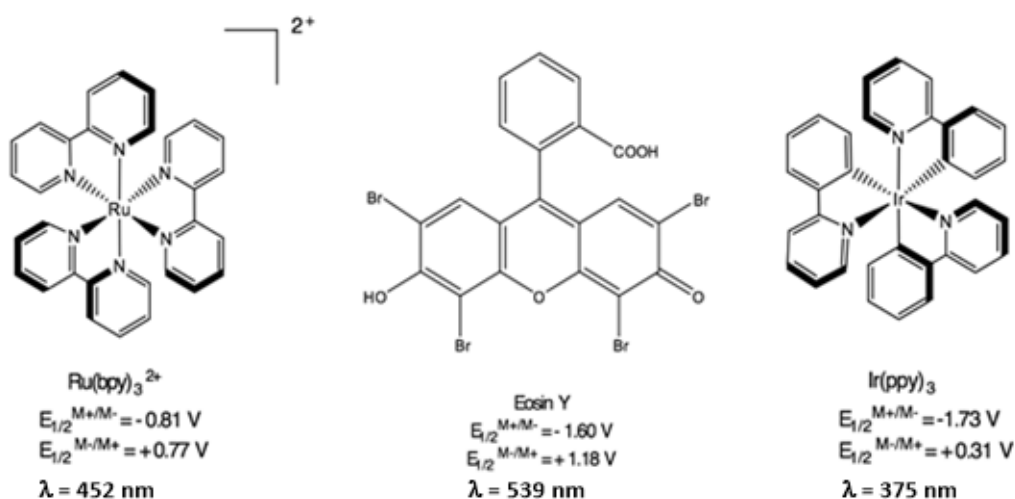


Figura 7. Estructura de  $\text{Ru(bpy)}_3^{2+}$ ,  $\text{Ir(ppy)}_3$ , y Eosina Y potenciales de oxidación/reducción y longitud de onda de máxima absorción<sup>15</sup>.

### 3. Fotocatalizadores

Las reacciones de fotocatalisis realizadas en este trabajo se llevaron a cabo con los catalizadores Ir(ppy)<sub>3</sub> y Eosina Y que se han ilustrado en el apartado anterior.

La catálisis con Eosina Y, que es un derivado 2', 4', 5', 7'- tetrabromado de la fluoresceína <sup>16</sup>, está siendo objeto de múltiples investigaciones dentro del ámbito de la síntesis orgánica en los últimos años. Es un catalizador orgánico y por ello presenta características especiales respecto a catalizadores de complejos metálicos convencionales como, por ejemplo, su disponibilidad inmediata, su sostenibilidad, así como su baja toxicidad y bajo precio.

Este colorante orgánico presenta cuatro estructuras diferentes en disolución: espirocíclica, EY1, neutra, EY2, monoaniónica, EY3 y dianiónica, EY4.

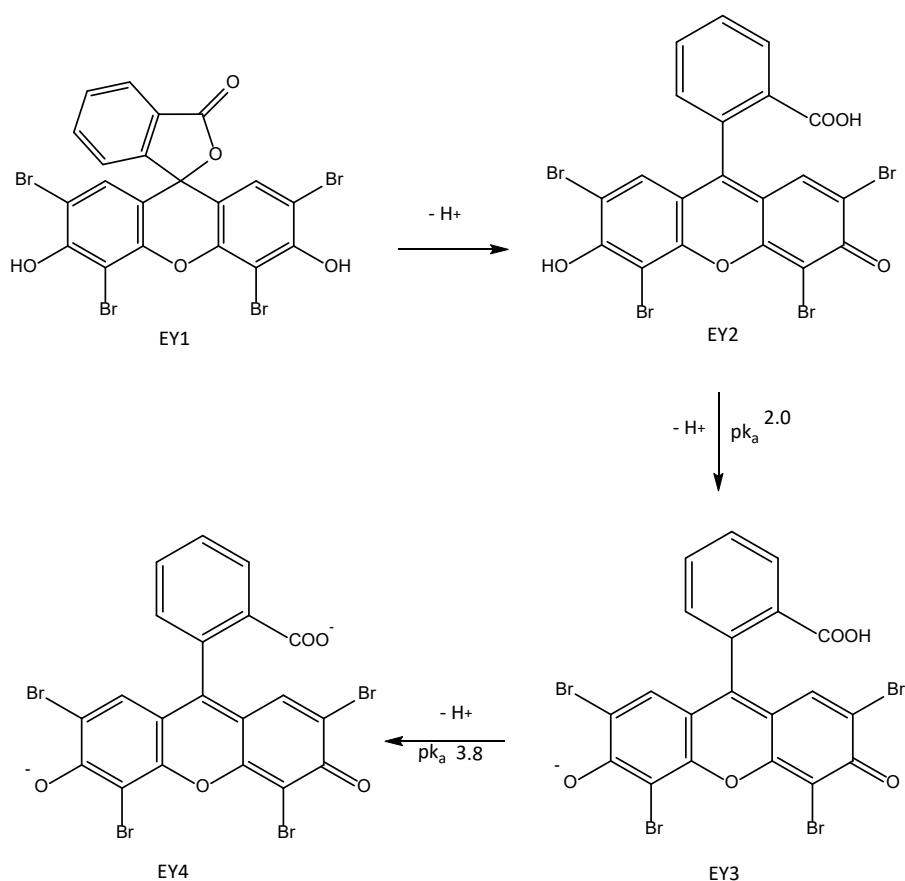


Figura 8. Comportamiento ácido-base de la Eosina Y<sup>16</sup>.

<sup>16</sup> Majek, M., Filace, F. and Wangelin, A. (2014). On the mechanism of photocatalytic reactions with eosin Y. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 10, pp.981-989.

Eosina Y tiene dos protones ácidos que pueden ser extraídos relativamente fácilmente. Debido a la presencia de estas cuatro posibles estructuras, hay una falta de claridad en la forma en la que se encuentra cuando tiene lugar la fotocátalisis.

El espirociclo de la forma EY1 presenta una conjugación ininterrumpida del anillo de fluorona lo que lo hace inactivo en fotocátalisis bajo irradiación con luz visible. La forma neutra EY2 presenta un estado fluorescente con tiempo de vida muy corto por lo que tampoco es apropiado en fotocátalisis. Sin embargo, EY3 y EY4 sí son activas catalíticamente. Que sean activas o no va depender del equilibrio ácido base ya que las formas EY3 y EY4 se generan *in situ* según el disolvente empleado.

Un ejemplo de esta controversia es el caso de la síntesis fotoredox de arilboranos pinacولات con Eosina Y, que en acetonitrilo no presenta absorción UV- visible ni formación de ningún compuesto, mientras que con DMSO, que es una base más fuerte que el acetonitrilo, presenta una gran absorción y da como resultado una síntesis con buenos rendimientos.

Con esto podemos concluir que las reacciones impulsadas por luz visible catalizadas con Eosina Y no pueden discutirse sin una especificación de la forma del colorante empleada y de las condiciones de reacción.

---

## OBJETIVOS

---





Los objetivos de este trabajo de fin de grado son los siguientes:

- Isomerización con luz visible de diferentes análogos del cromóforo de la proteína verde fluorescente.
- Comparación del uso como fotocatalizador de un colorante orgánico frente a un complejo metálico.
- Estudio del comportamiento de los diferentes análogos frente a la fotocatálisis promovida mediante irradiación con luz visible.



---

DESARROLLO DE

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



Con los interruptores moleculares proporcionados por el grupo de investigación de fotoquímica de la Universidad de la Rioja y con el sintetizado para este trabajo se llevó a cabo un estudio fotoquímico. Como ya se ha explicado anteriormente el interruptor molecular tiene la capacidad de pasar de un estado a otro por acción de un estímulo externo. En nuestro caso lo que ocurre es una isomerización del doble enlace exocíclico, pudiendo pasar del conformo *E* al *Z*. En todos los casos se parte del isómero *E*.

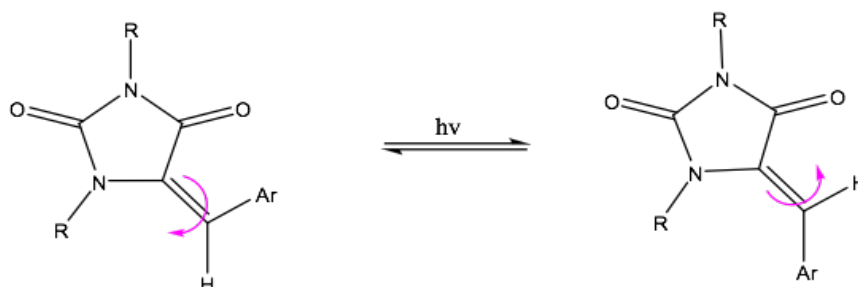


Figura 9. Proceso fotoquímico de los interruptores basados en el cromóforo de la GFP.

La estructura de los compuestos que vamos a estudiar es la siguiente:

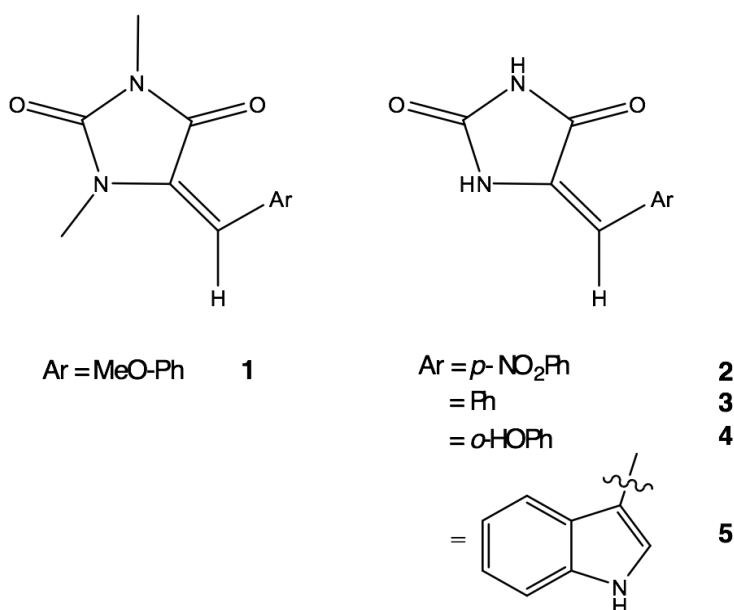


Figura 10. Estructura de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4** y **5**.

Estos análogos se utilizaron en este grupo de investigación para su estudio fotoquímico mediante irradiación con luz UV<sup>14</sup>.

Tras la irradiación se obtuvieron estados fotoestacionarios con distintas proporciones *Z/E* para cada compuesto.

Antes de llevar a cabo la irradiación es conveniente conocer las longitudes de onda para la banda de máxima absorción de cada compuesto.

*Tabla 1.* Longitudes de onda máximas de absorción de los compuestos utilizados.

Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
<b>1</b>	333
<b>2</b>	353
<b>3</b>	317
<b>4</b>	340
<b>5</b>	367
<b>6</b>	334

### Estudio fotoquímico

Se llevaron a cabo inicialmente irradiaciones de los compuestos **1** y **4** en presencia de un 5 % de catalizador Ir(ppy)<sub>3</sub>, obteniéndose los siguientes resultados.

*Tabla 2.* Resultados de la isomerización de los compuestos **1** y **4** con un 5% de Ir(ppy)<sub>3</sub>.

Compuesto	Tipo de luz	E:Z
<b>1</b>	Luz azul	38:62
<b>1</b>	Luz verde	43:57
<b>4</b>	Luz azul	95:5

Como se puede observar en el compuesto **1** obteníamos resultados aceptables de isomerización, sin embargo, en el caso del compuesto **4** no. Esto podría ser debido a la formación de puente de hidrogeno entre el grupo hidroxilo y el carbonilo como se muestra en la Figura 11.

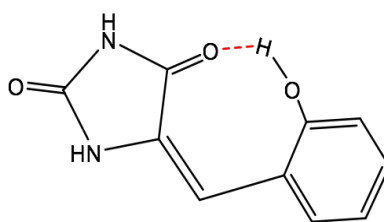


Figura 11. Estructura del compuesto **4** con posible puente de hidrogeno.

Al ver que con este catalizador el compuesto **4** no isomeriza y el compuesto **1** no daba unos resultados demasiado buenos, se probó a realizar las reacciones fotoquímicas con un colorante orgánico, en concreto Eosina Y. Se utilizó como en el caso anterior un 5%.

Tabla 3. Resultados isomerización compuesto **1** y **4** con un 5% de Eosina Y.

Compuesto	Tipo de luz	E:Z
<b>1</b>	Luz azul	7:93
<b>1</b>	Luz verde	7:93
<b>1</b>	Luz blanca	6:94
<b>4</b>	Luz azul	97:3

Como podemos ver los resultados del compuesto **1** mejoraron considerablemente, por ello se decidió disminuir la cantidad de catalizador utilizado. Las condiciones más eficientes y las que finalmente usamos fueron irradiación con luz blanca y un 2% de catalizador Eosina Y.

Por otro lado, en el compuesto **4** se mantenía igual que con la irradiación en presencia del catalizador Ir(ppy)<sub>3</sub>. Para conseguir la isomerización de éste se recurrió a los resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación de fotoquímica de la Universidad de La Rioja, donde describen fotoisomerizaciones de estos compuestos con condiciones más energéticas, tal y como se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Máximos de absorción y estados fotoestacionarios de compuesto **1-5** utilizando diferentes longitudes de onda de irradiación<sup>13</sup>.

Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}^{\text{a}}$	(E:Z) <sup>b</sup>	(E:Z) <sup>c</sup>
<b>1</b>	333	5:95	35:65
<b>2</b>	353	64:36	53:47
<b>3</b>	317	100:0 <sup>d</sup>	95:5
<b>4</b>	340	86:14	48:52
<b>5</b>	367	89:11	22:78

<sup>a</sup> Valor en nm de isomero E. <sup>b</sup> Usando una lámpara de Hg de media presión con filtro de Pyrex.

<sup>c</sup> Usando fotorreactor a 350 nm. <sup>d</sup> Fotoisomerización en cuarzo.

Se utilizaron las condiciones de la Tabla 4 para los compuestos **2**, **3**, **4** y **5** ya que todos mostraban el mismo comportamiento de no isomerización frente a la irradiación con luz visible. En todos los casos se usó DMSO-d<sub>6</sub> como disolvente, obteniéndose los siguientes resultados.

**Tabla 5.** Estado fotoestacionario de los compuestos **2** al **5**, condiciones y tiempo necesario.

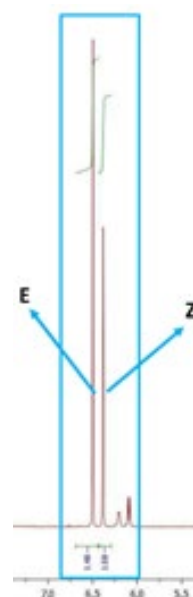
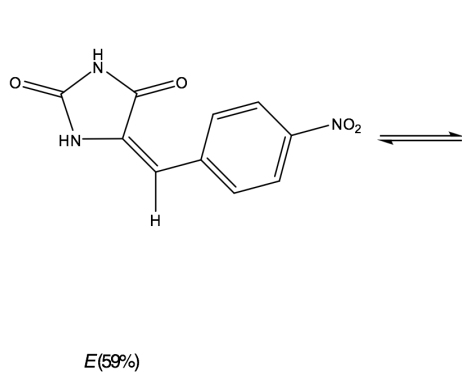
Compuesto	Tipo de irradiación	Tiempo	E:Z
<b>2</b>	Fotorreactor 350 nm	2 horas	59:41
<b>3</b>	Lámpara Hg con un filtro de cuarzo	45 minutos	82:18
<b>4</b>	Fotorreactor 350 nm	2 horas	59:41
<b>5</b>	Fotorreactor 350 nm	2 horas 30 min	30:70

Como se puede ver se obtuvieron resultados muy similares a los de la publicación.

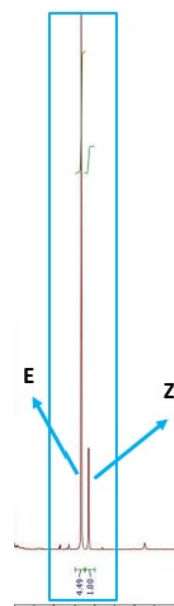
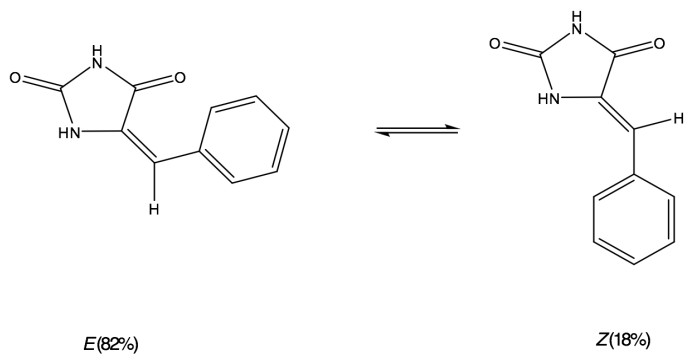
A continuación, se muestran las señales de RMN <sup>1</sup>H pertenecientes a cada isómero de la mezcla.



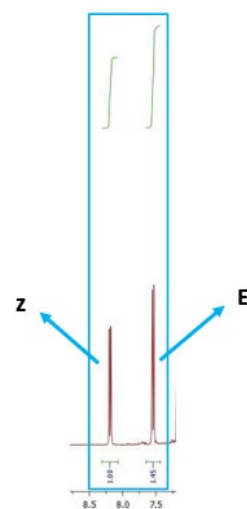
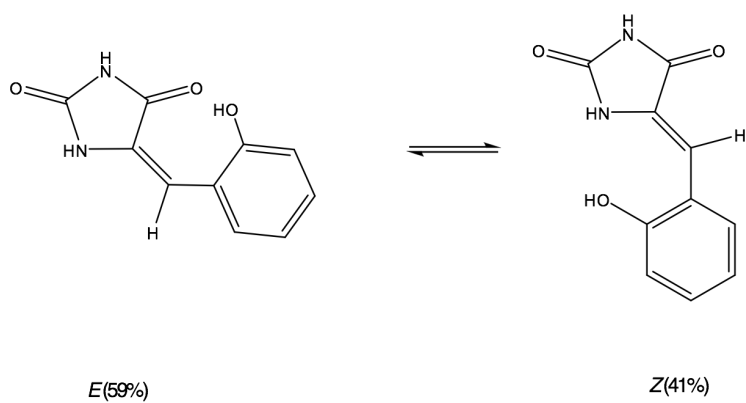
✓ Compuesto 2:



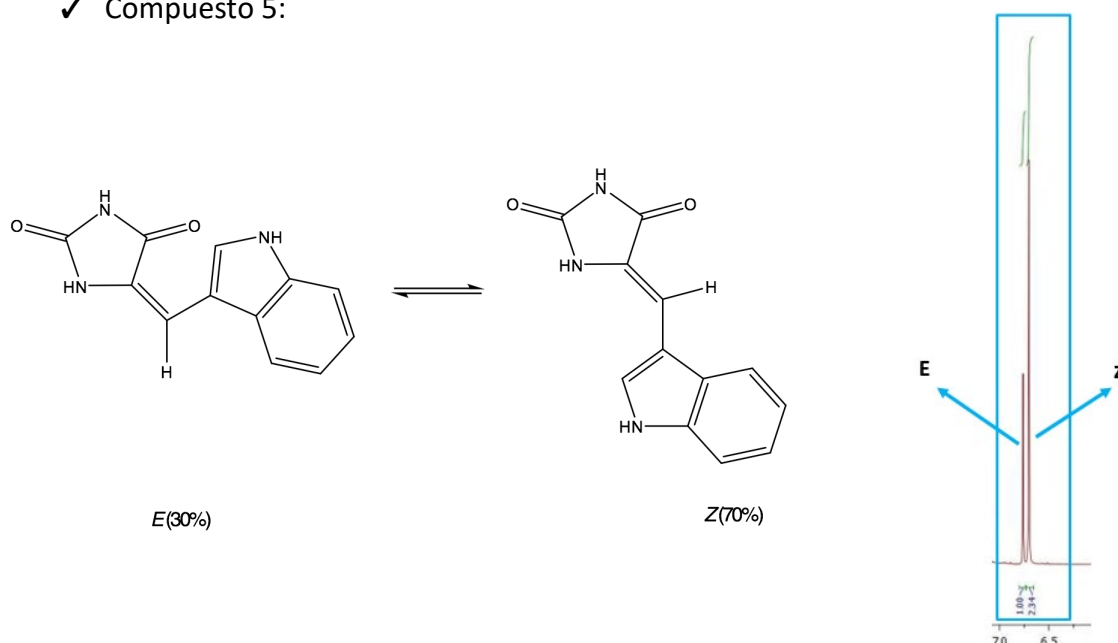
✓ Compuesto 3:



✓ Compuesto 4:



## ✓ Compuesto 5:



Una vez tuvimos la mezcla de isómeros *E:Z* en las proporciones descritas en la tabla anterior se intentó revertir nuevamente la proporción para volver a tener el 100 % del isómero *E*. Se utilizaron las condiciones optimizadas descritas al inicio de la discusión: 2% de catalizador Eosina Y y luz blanca como fuente de irradiación.

Las irradiaciones se realizaron de tal forma que cada tres horas se comprobaba la proporción de cada isómero en la mezcla mediante RMN  $^1\text{H}$ , así conseguimos utilizar el tiempo de irradiación mínimo necesario para llegar al estado fotoestacionario.

*Tabla 6.* Resultados de la irradiación con luz blanca de los compuestos **2**, **3**, **4** y **5**.

Compuesto	Tiempo irradiación	<i>E:Z</i>
<b>2</b>	24 horas	95:5
<b>3</b>	6 horas	99:1
<b>4</b>	6 horas	100:0
<b>5</b>	24 horas	98:2

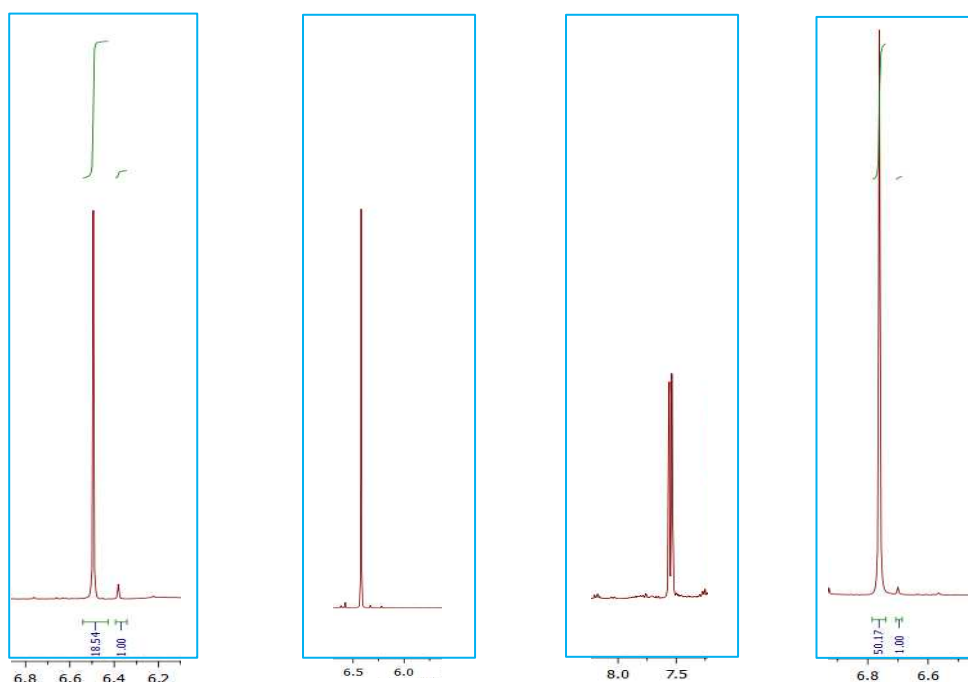


Figura 12. Señales identificativas de los compuestos **2**, **3**, **4** y **5** tras la irradiación con luz visible.

Finalmente, al observar que los compuestos **2**, **3**, **4** y **5** se comportaban de igual forma, es decir, como almacenadores de energía, ya que el isómero de partida *E* era mucho más estable que el *Z*, mientras que el compuesto **1** se comportaba como un interruptor molecular nos preguntamos cuál podría ser la causa de esta diferencia en compuestos con estructuras tan similares. La diferencia más significativa a primera vista era la presencia de grupos metilo en los nitrógenos de la imidazolidina, por ello se decidió sintetizar el compuesto **1** sin metilar (**6**) y estudiar su comportamiento fotoquímico.

#### Síntesis de nuevo interruptor molecular y estudio fotoquímico de éste.

Se llevó a cabo la síntesis de un nuevo interruptor molecular basado en el cromóforo de la proteína verde fluorescente mediante la reacción de imidazolidina-2,4-diona con 4-metoxibenzaldehído en presencia de acetato de amonio y ácido acético como disolvente, a una temperatura de 120 °C, obteniéndose (*E*)-5-(4-metoxibenciliden) imidazolidina-2,4-diona (**6**), con un rendimiento del **68 %**.

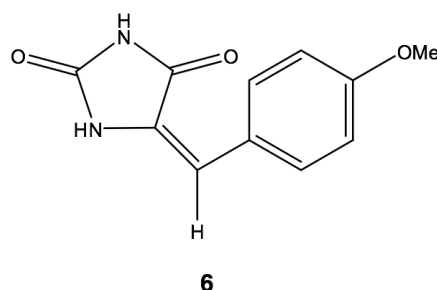
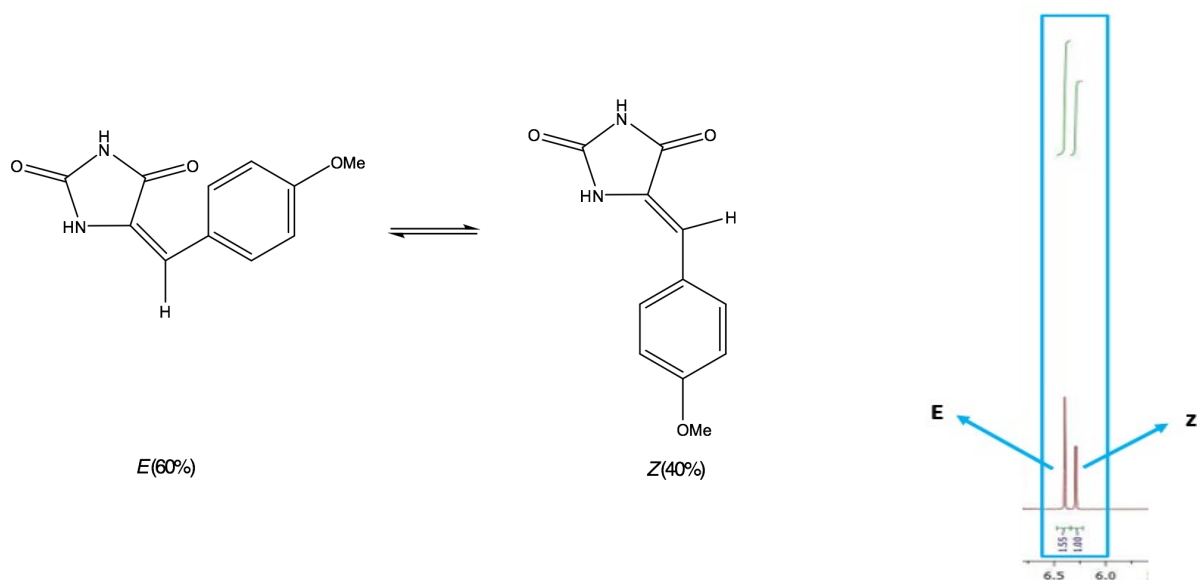


Figura 13. Estructura del compuesto **6**.

Como en los casos anteriores la irradiación con luz visible no producía la isomerización de este compuesto, por ello se llevó a cabo con una fuente más energética, en este caso se utilizó en primer lugar la lámpara de Hg de media presión con filtro de cuarzo, pero producía la descomposición del producto por lo que el análisis con RMN era complicado. Debido a esto se probó la irradiación en el fotorreactor a 350 nm obteniéndose buenos resultados. Tras dos horas obtuvo un ratio *E*:*Z* de 60:40.



Seguidamente se irradió con luz visible durante 24 horas para volver al estado inicial llegando a obtener un 100 % del *E*.

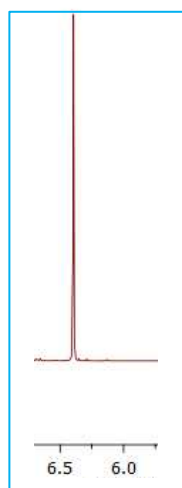


Figura 14. Señal identificativa del compuesto 6 tras irradiación con luz visible.

---

## CONCLUSIONES

---



- En este trabajo de fin de grado hemos sido capaces de isomerizar con luz visible diferentes compuestos que, hasta la fecha, solo habían sido estudiados con irradiaciones de luz UV.
- Hemos podido comprobar que la fotocatalisis con Eosina Y proporciona mejores resultados que  $\text{Ir(ppy)}_3$ .
- Todo ello supone que hemos conseguido realizar reacciones fotoquímicas de una forma eficiente, controlada, respetuosa con el medio ambiente y relativamente económica.
- Hemos comprobado la gran estabilidad fotoquímica que presentan estos análogos de la GFP, ya que solo en el caso del compuesto **6** con irradiación con lámpara de Hg de media presión con filtro de cuarzo se observó descomposición del compuesto, por lo que esto indica la gran aplicabilidad de este tipo de compuestos.
- Por último, según los resultados experimentales obtenidos, la presencia de grupos metilo en los nitrógenos de la imidazolidina podría ser un factor determinante en el comportamiento fotoquímico de este grupo de compuestos.
- En los compuestos **2, 3, 4, 5 y 6** observamos un comportamiento de almacenamiento de energía, ya que la isomerización del isómero *E* al *Z* solo era posible mediante irradiación UV y una vez teníamos el *Z* para conseguir nuevamente el 100% del *E* eran necesarias condiciones más suaves (luz visible y 2% de fotocatalizador). Esto podría ser un indicativo de que el isómero *E* es más estable que el *Z*.
- En compuesto **1** observamos un comportamiento de interruptor molecular, tanto la isomerización del *E* al *Z* como la del *Z* al *E* se pueden realizar con luz visible. Esto podría deberse a que el sustituyente aromático sufriera más impedimento estérico por la presencia de los grupos metilo, por ello la isomerización del doble enlace sería más factible.
- Para poder conocer el porqué de estas diferencias de comportamiento sería necesario un estudio más detallado.





PROCEDIMIENTO

EXPERIMENTAL



## 1. Consideraciones generales

### - Resonancia magnética nuclear

La caracterización de los compuestos y seguimiento de las reacciones se llevó a cabo con el equipo de resonancia magnética nuclear Bruker-ARX-300 y/o Bruker Avance 400 realizándose tanto  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Se han utilizado como disolventes  $\text{CDCl}_3$  con TMS como referencia interna o  $\text{DMSO-d}_6$ . Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm. Las multiplicidades de las señales se indican de la siguiente forma: (s) = single-te, (d) = doblete, (t) = triplete, (c) = cuatriplete.

### - Espectroscopía ultravioleta-visible

Para la realización de espectros de absorción molecular se utilizó un espectrofotómetro de fila de diodos modelo HP 8451 A. Se midieron disoluciones de concentración  $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### - Lámparas e instrumentación fotoquímica

Las irradiaciones se realizaron en reactores de inmersión de Pyrex o de cuarzo empleando un cilindro de vidrio Pyrex como filtro y utilizando lámparas de mercurio de media presión de 400W de la marca Photochemical Reactors LTD (UK).

### - Lámpara LED

Se realizaron irradiaciones con lámparas LED de 50 W azul, verde, roja y blanca.

### - Fotorreactor a 350 nm

Se realizaron irradiaciones con un fotorreactor provisto de una lámpara ultravioleta ( $\lambda_{\text{máx}} = 350 \text{ nm}$ ).

### - Espectrometría de masas

Los análisis de espectrometría de masas se han realizado en un equipo HP 5989B provisto de una interfase de electrospray HP 59987A y se registraron en modo ion positivo e ion negativo.

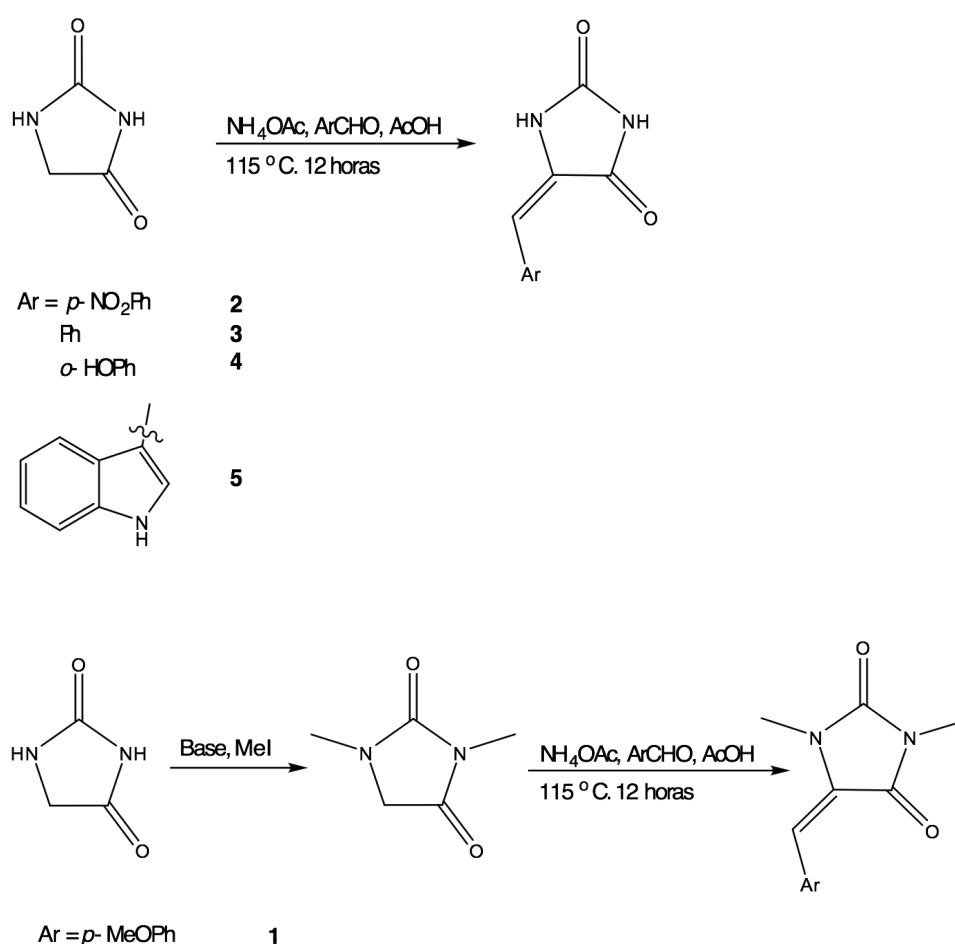
### - Cromatografía

Las cromatografías de columna se han realizado con una fase estacionaria de gel de sílice y como fase móvil los eluyentes especificados en cada caso.

## 2. Síntesis de interruptores moleculares basados en el cromóforo de la GFP.

Los interruptores moleculares utilizados fueron facilitados por el grupo de investigación de fotoquímica de la Universidad de la Rioja. Se sintetizaron a partir de la condensación de hidantoína y diferentes aldehídos aromáticos en una mezcla de ácido acético/acetato amónico obteniendo 5-arilidenhidantoínas. Finalmente, alguno de los interruptores moleculares era necesario metilarlos, por lo que se hicieron reaccionar con exceso de ioduro de metilo para obtener 1,3-dimetil-5 arilidenhidantoínas.

Modificando el sustituyente del grupo aromático del aldehído con el que se da la reacción se obtuvo un compuesto u otro. La síntesis que realizaron fue la siguiente<sup>14</sup>:

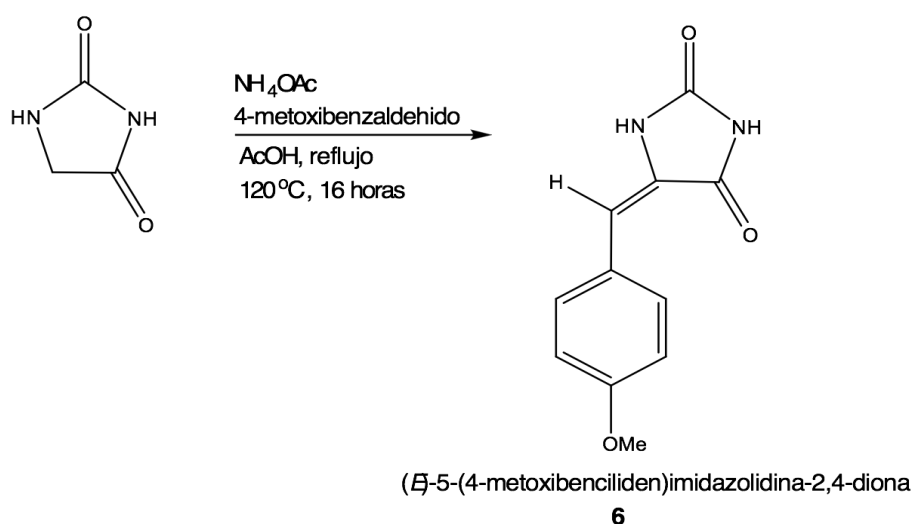


En ambas síntesis se obtuvo únicamente el isómero *E*.

### 3. Síntesis del compuesto 6

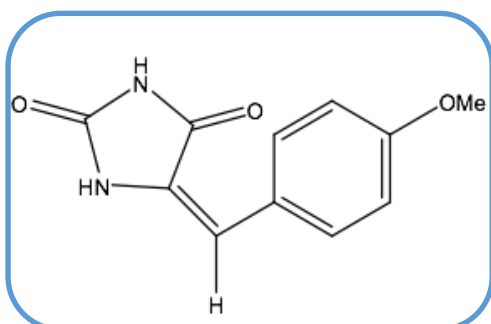
Para completar el estudio fotoquímico se llevó a cabo la síntesis de (*E*)-5-(4-metoxibenciliden)imidazolidina-2,4-diona.

En primer lugar, a una disolución de imidazolidina-2,4-diona (2.0 g, 20 mmoles) y acetato de amonio (277 mg, 3.6 mmol) en ácido acético (5 mL) se le añadió 4-metoxibenzaldehído (2.42 mL, 20 mmol). La mezcla se agitó a 120 °C durante 16 horas en un matraz con reflujo y provisto de un agitador magnético. La mezcla de reacción se dejó enfriar y posteriormente se concentró a vacío. El aceite obtenido se disolvió en acetona y se filtró en placa porosa dejándolo con succión varias horas con el fin de eliminar el disolvente y obtener nuestro compuesto purificado y seco (**6**).



#### 3.1 Caracterización del compuesto 6

##### (*E*)-5-(4-metoxibenciliden)imidazolidina-2,4-diona



Fórmula molecular:  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$

Peso molecular: 218 g/mol

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  10.73 (s, 2H), 7.60 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.97 (d,  $J = 11.5$  Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 3.78 (s, 3H).

**$^{13}\text{C}$  RMN:** (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  166.10, 159.88, 156.15, 131.52, 126.56, 125.91, 114.68, 109.22, 55.53.

**UV-Vis** ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\lambda_{\text{máx}}$  (nm) = 335 nm.

**Masa Exacta ESI (+) ( $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{H}^+$ ):** calculada 219.0770 g/mol; medida 219.0767.

#### 4. Estudio fotoquímico

Se realizó el estudio fotoquímico de todos los compuestos operando de la siguiente manera:

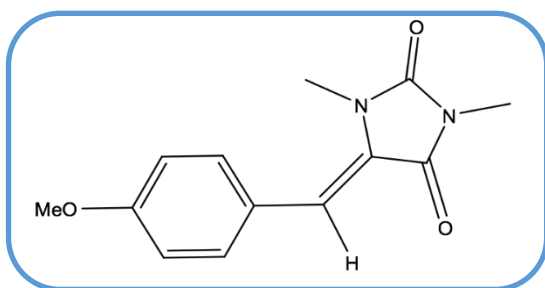
Se pesaron 0.1 mmoles del compuesto y entre un 5 y un 2 % del fotocatalizador en balanza analítica, para posteriormente disolver este sólido en 0.8 mL de cloroformo deuterado para compuesto **1** y en  $\text{DMSO-d}_6$  para el resto (**2, 3, 4, 5 y 6**).

Esta mezcla se llevó a un tubo de RMN para proceder a su irradiación y se hizo el seguimiento de la reacción mediante resonancia magnética nuclear de protón.

#### 5. Separación cromatografía de isómeros

Debido a los problemas de solubilidad de los compuestos utilizados solo se pudo aislar el isómero Z del compuesto **1**.

Para ello se hizo una columna de sílica utilizando como eluyente una mezcla hexano:acetato de etilo en proporciones 1:1. Se obtuvieron 0.015 g (0.061 mmoles).



- Compuesto **1-Z**.

Fórmula:  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$

Peso molecular: 246 g/mol

**$^1\text{H}$  RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.3-7.2 (m, 3H), 6.95 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 3.08 (s, 3H).

---

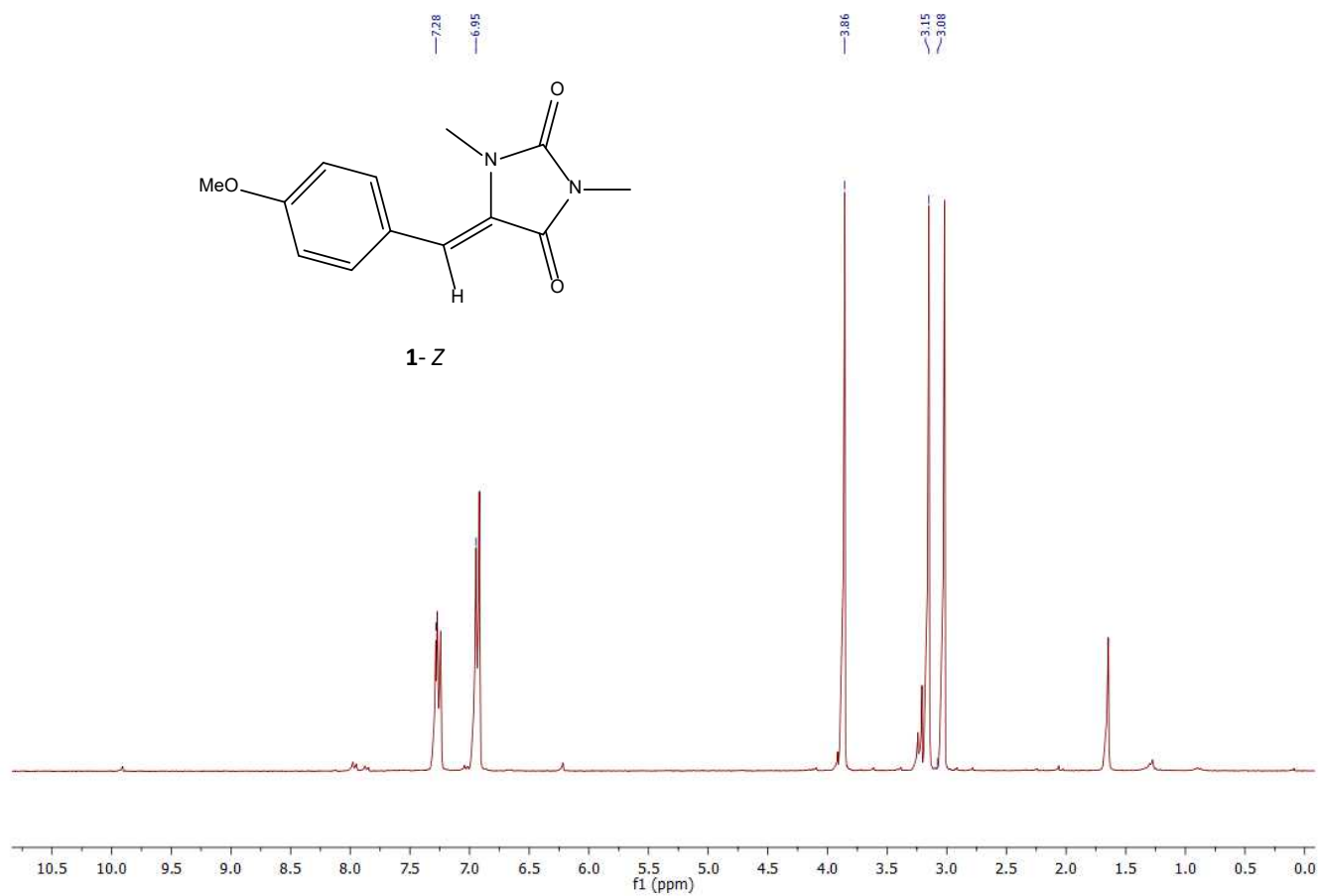
## ANEXOS

---

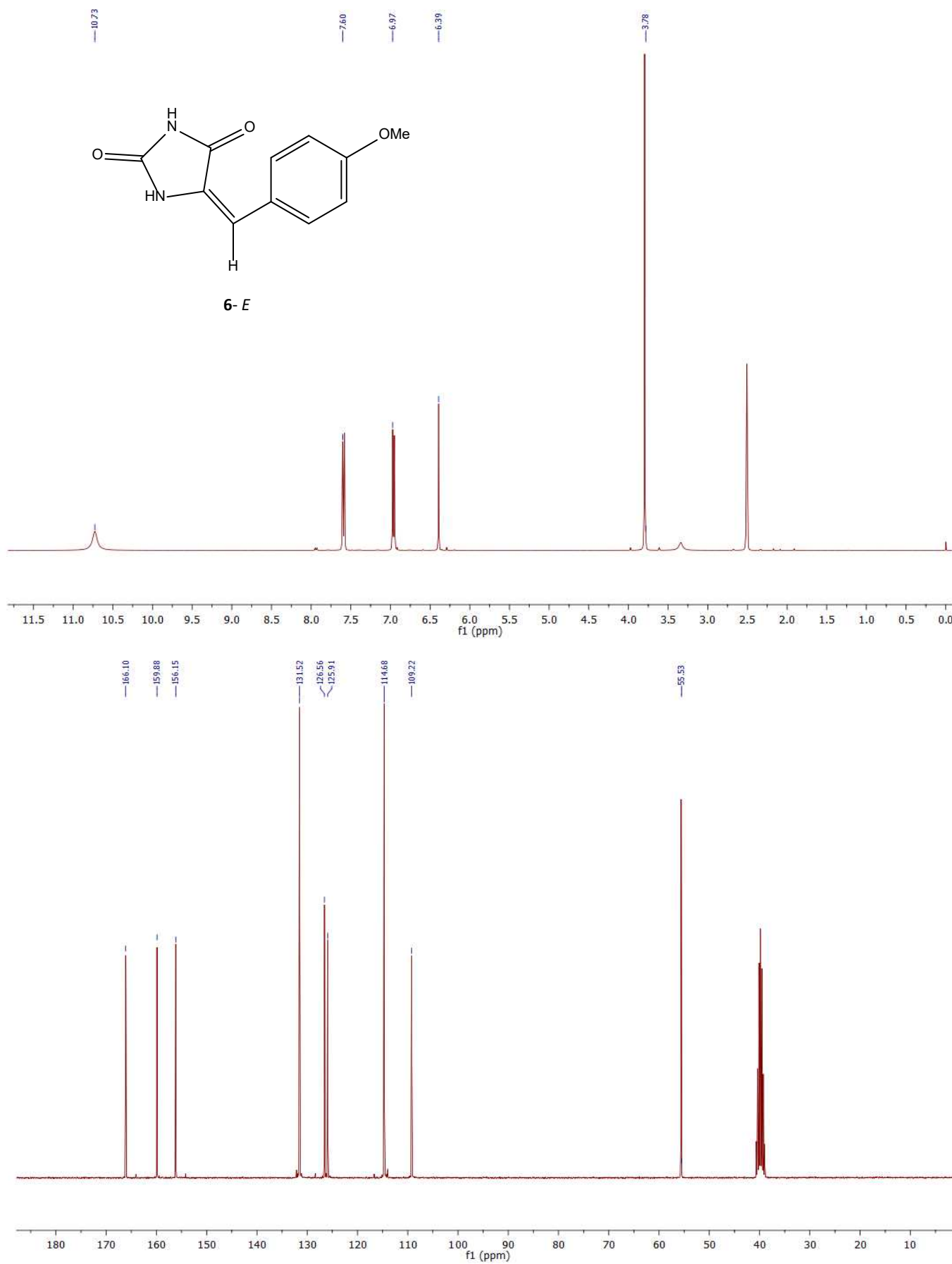




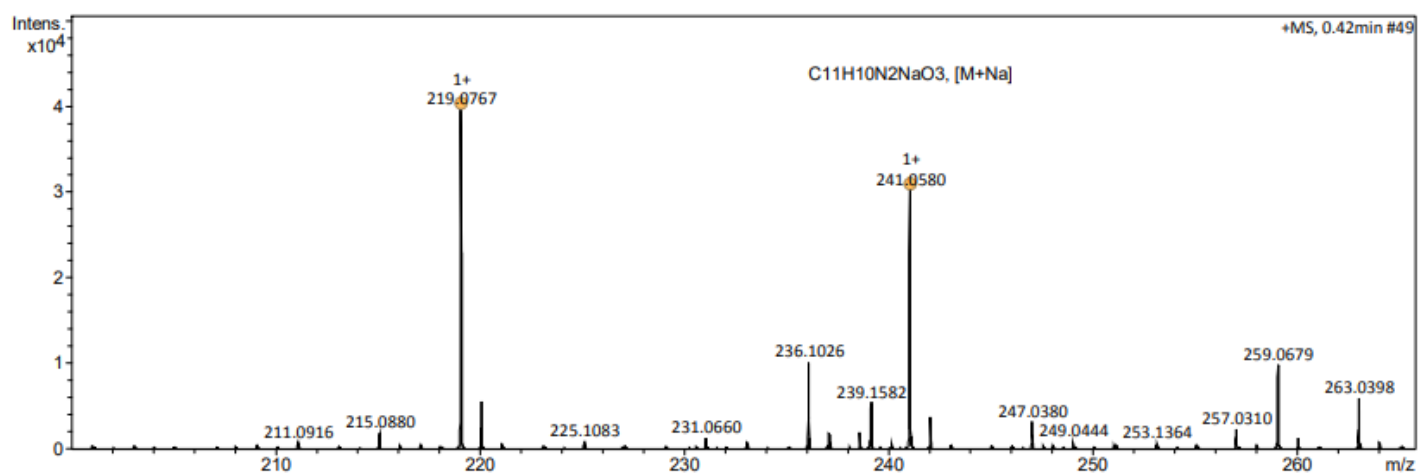
- Espectro  $^1\text{H}$  RMN del isómero Z del compuesto **1**.



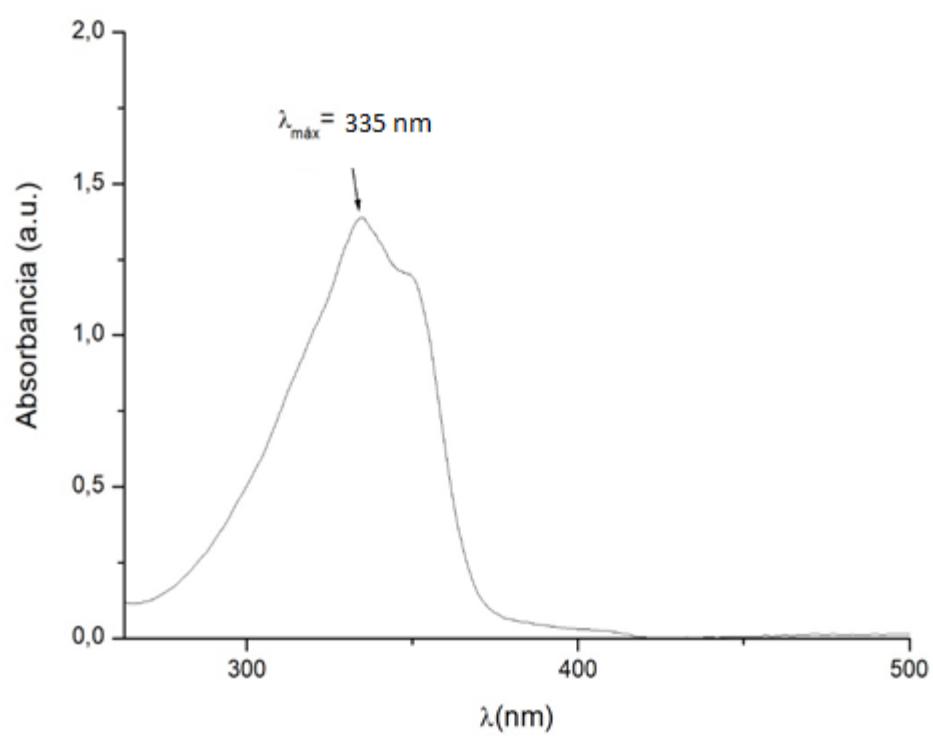
- Espectros  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN del producto de la síntesis del compuesto **6**.



- Masas compuesto 6.

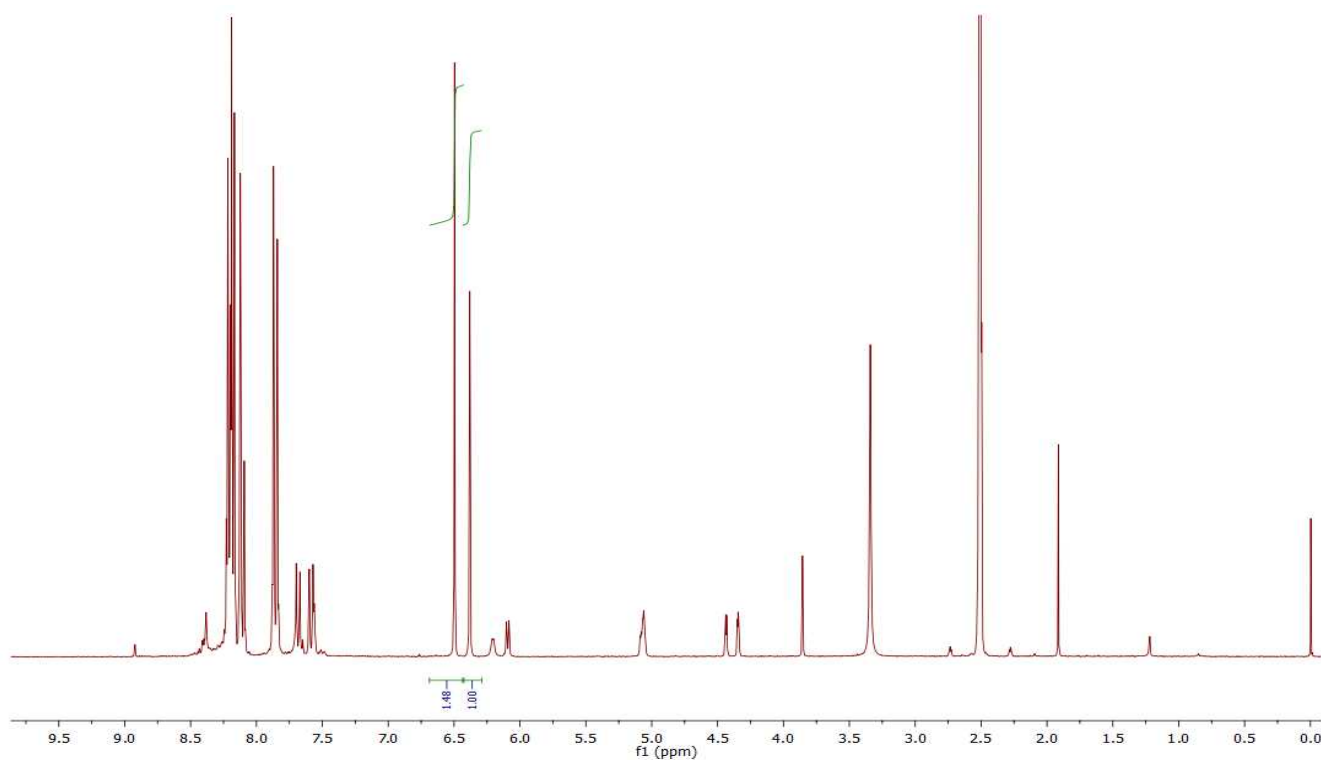


- Espectro de absorción UV-Vis del compuesto 6.

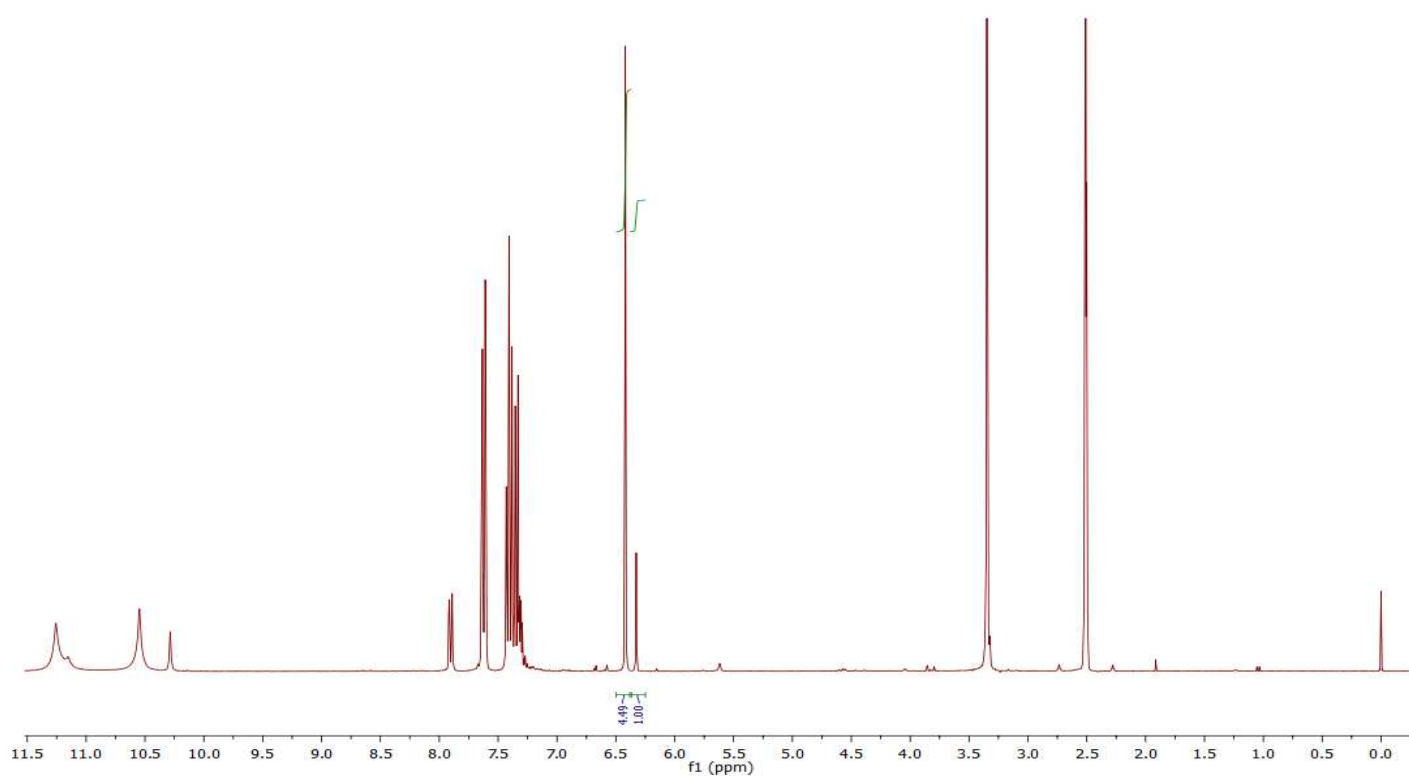


- Espectros  $^1\text{H}$  RMN pertenecientes a la Tabla 5.

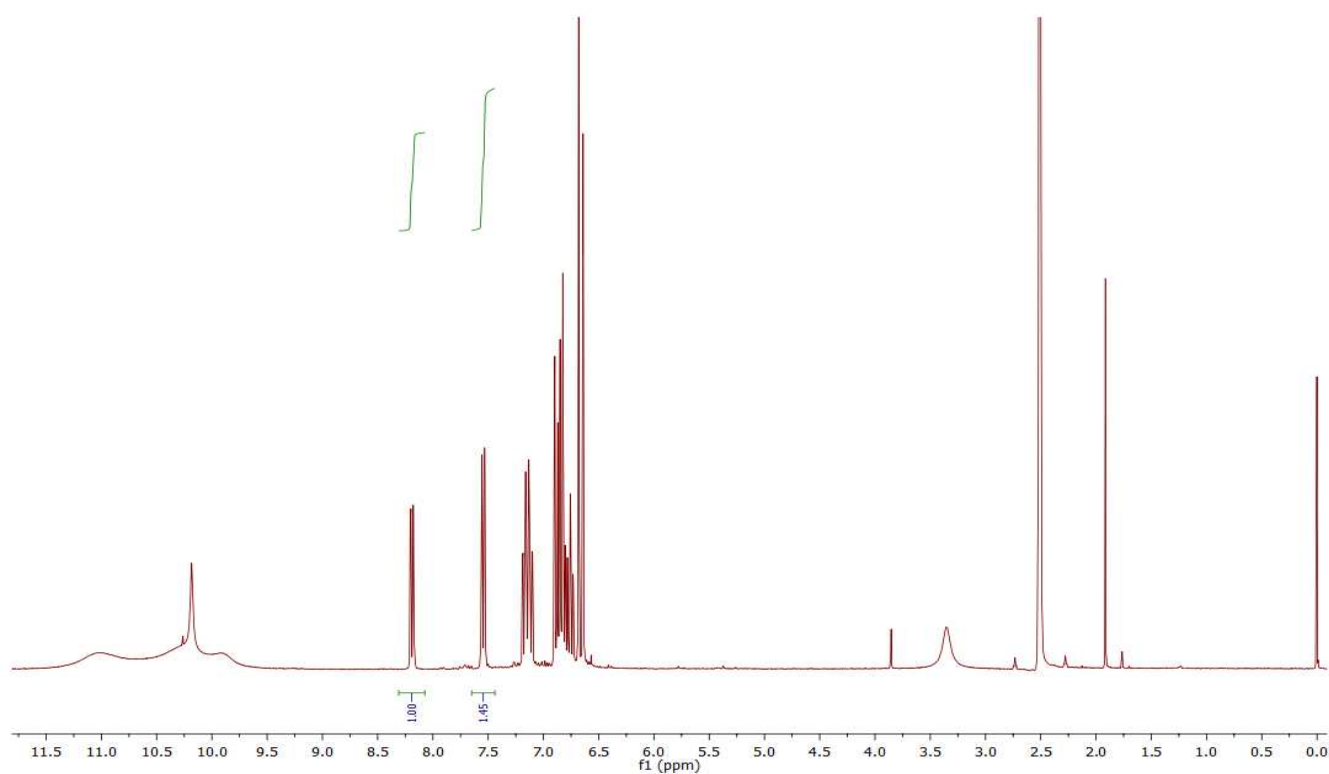
### Compuesto 2



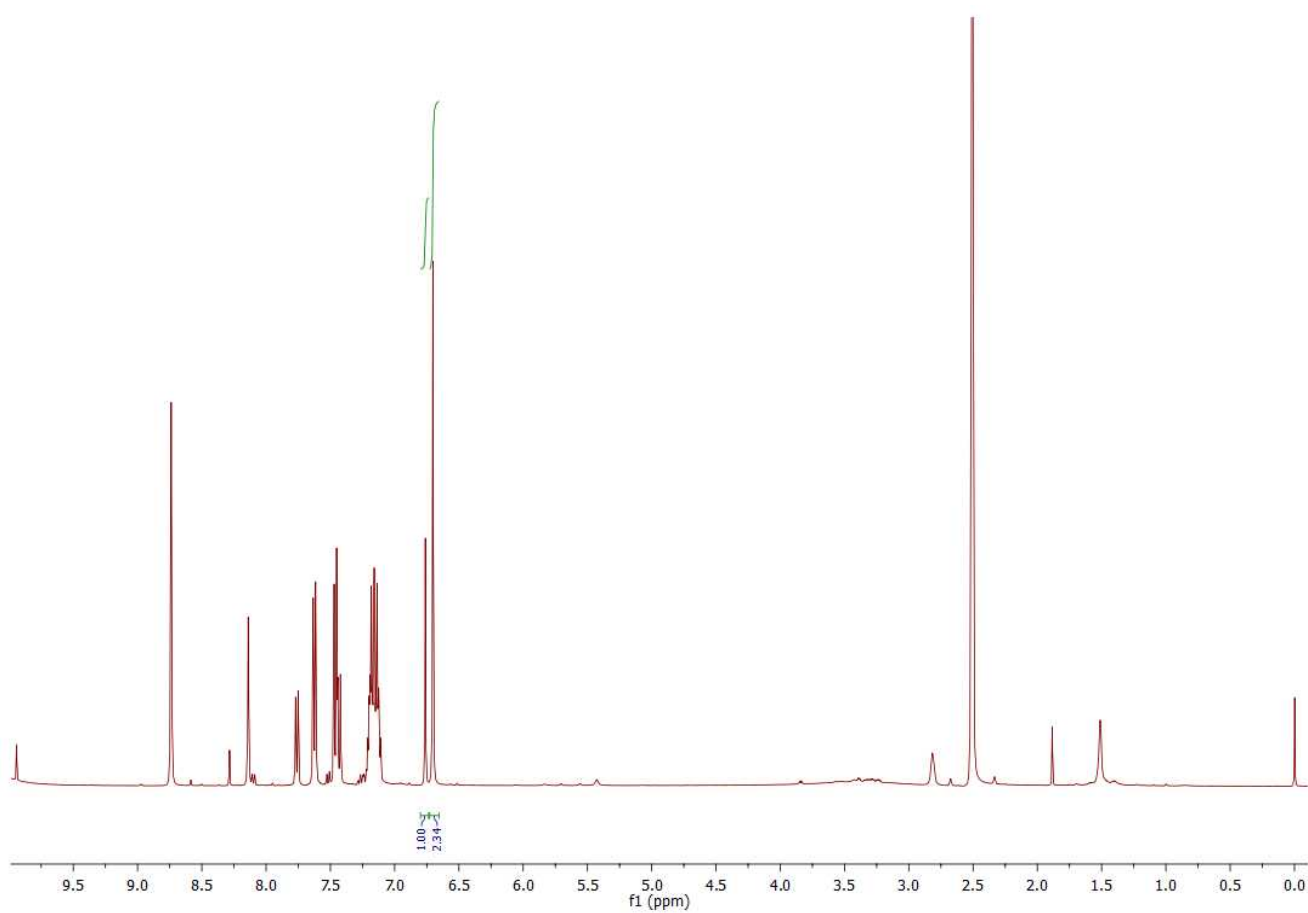
### Compuesto 3



Compuesto 4



Compuesto 5



- Espectro  $^1\text{H}$  RMN del compuesto **6** tras la isomerización en el fotorreactor a 350 nm.

